

PCT/JP03/11056

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

29.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 3月18日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-073344
[ST. 10/C]: [JP2003-073344]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社 ビーエフ研究所
堂浦 克美

REC'D 17 OCT 2003

WIPO PCT

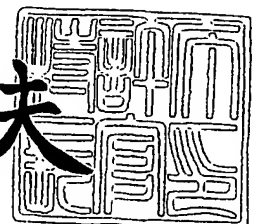
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2003-3001044

【書類名】 特許願
 【整理番号】 188296
 【提出日】 平成15年 3月18日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 A61K 49/00
 A61K 51/00
 C07D209/00
 C07D235/00
 C07D263/00
 C07D277/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市千里山東 1 - 1 5 - 1 1 第1ヴィラサン
 テ 1 0 5

【氏名】 工藤 幸司

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市上野町 2 8 - 4 0 1

【氏名】 澤田 徹

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県福岡市城南区茶山 6 - 1 6 - 7 6 - 7 0 1

【氏名】 堂浦 克美

【特許出願人】

【持分】 070/100

【識別番号】 399009435

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目 1 7 番 8 5 号

【氏名又は名称】 株式会社 ビーエフ研究所

【特許出願人】

【持分】 030/100

【識別番号】 502317286

【住所又は居所】 福岡県福岡市城南区茶山 6-16-76-701

【氏名又は名称】 堂浦 克美

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100086405

【弁理士】

【氏名又は名称】 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100081422

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 光雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0209518

【包括委任状番号】 0215258

【プルーフの要否】 要

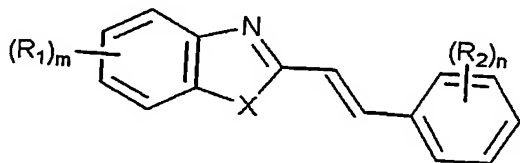
【書類名】 明細書

【発明の名称】 プリオン蛋白蓄積性疾患の診断プローブおよび治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断プローブとして使用される、式 I :

【化 1】



[式中、 R_1 および R_2 は独立して水素、ハロゲン、 OH 、 $COOH$ 、 SO_3H 、 NR_3R_4 、 NO_2 、炭素数 1~4 個のアルキル、または O -炭素数 1~4 個のアルキルであり、

R_2 がパラ位にある場合には当該パラ位の R_2 は NR_3R_4 でなく、

R_3 および R_4 は独立して水素、または炭素数 1~4 個のアルキルであり、

X は S 、 O 、 NH または CH_2 であり、

m および n は独立して 0~4 の整数である]

で示される化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 2】 $N-407$ 、 $N-408$ 、 $N-438$ 、 $N-440$ 、 $N-441$ および $N-454$ からなる群より選択される請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】 標識されている請求項 1 または 2 に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 4】 標識が放射性核種である請求項 3 に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 5】 置換基 R_1 ないし R_4 のいずれかが放射線放出核種で標識されている請求項 4 に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 6】 標識が γ 線放出核種である請求項 4 または 5 に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 7】 γ 線放出核種が ^{99m}Tc 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{201}Tl 、 ^{123}I および ^{133}Xe からなる群より選択されるものである請求項 6

記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 8】 γ 線放出核種が ^{99m}Tc および ^{123}I からなる群より選択されるものである請求項 7 記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 9】 標識が陽電子放出核種である請求項 4 または 5 に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 10】 陽電子放出核種が ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O および ^{18}F からなる群より選択される請求項 9 記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 11】 陽電子放出核種が ^{18}F である請求項 10 記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 12】 請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物および医薬上許容される担体を含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断用組成物。

【請求項 13】 請求項 4 ないし 11 のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物および医薬上許容される担体を含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断用組成物。

【請求項 14】 請求項 8 記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を含む請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】 請求項 11 記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を含む請求項 13 記載の組成物。

【請求項 16】 請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須の構成成分として含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断用キット。

【請求項 17】 請求項 4 ないし 11 のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須の構成成分として含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断用キット。

【請求項 18】 請求項 8 記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須の構成成分として含む請求項 17 記載のキット。

【請求項 19】 請求項 11 記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須の構成成分として含む請求項 17 記載のキット。

【請求項 20】 被験動物から試料を得て、該試料に請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を接触させることを特徴とする、生体内にプリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体の体外診断方法。

【請求項 21】 生体内にプリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体の体外診断のための、請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を含む組成物。

【請求項 22】 生体内にプリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体の体外診断のための、請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須構成成分として含むキット。

【請求項 23】 請求項 1 または 2 記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物および医薬上許容される担体を含有する、生体内のプリオン蛋白の蓄積が病因または病因の一部となる疾患の予防および／または治療用医薬組成物。

【請求項 24】 疾患が伝達性海綿状脳症あるいはプリオン病からなる群より選択される請求項 23 記載の医薬組成物。

【請求項 25】 化合物が N-407、N-441、N-453 および N-457 からなる群より選択されるものである請求項 23 または 24 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断プローブ、特に、陽電子放出核種により標識されたプローブ、ならびに該プローブを含む診断用組成物に関する。さらに本発明は、プリオン蛋白が脳に蓄積する疾患の予防／治療用組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

いわゆるプリオン蛋白が脳に蓄積する疾患には、ヒトではクロイツフェルト・

ヤコブ病 (CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病 (GSS)、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (v-CJD)、致死性家族性不眠症 (FFI)、クルー、ヒト以外の動物ではヒツジスクレイピー、ウシ海綿状脳症 (BSE)、伝達性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症などが知られており、いずれも致死性の感染性神経難病である。

これらの疾患においては、罹患した個体の脳をすりつぶして他の健常な個体に投与すると、疾病を伝播させることが可能であり、さらに罹患した脳では海綿状の病変がおこることから、これらの疾病は、伝達性海綿状脳症 (transmissible spongiform encephalopathy; TSE) と呼ばれている。

【0003】

プリオンという概念は伝達性海綿状脳症の原因因子として感染性蛋白質粒子 (proteinaceous infectious particle)、すなわちプリオン (prion) として1982年スタンレー・プルシナーによって初めて提唱された。プリオンとは病気の伝達に必要な不可欠な病原体の本体が蛋白のみであり、自己複製に必要な核酸をそれ自身に含まない病原体の総称である。最近では伝達性海綿状脳症の病原体として異常プリオン蛋白が見出され、また伝達性海綿状脳症においてはプリオン蛋白が蓄積することから、同脳症はプリオン病と呼ばれるのが一般的になってきている。

【0004】

ヒトプリオン蛋白は253アミノ酸からなる塩基性蛋白で、第20番染色体短腕にコードされている。正常プリオン蛋白はそのなかに3%以下の β シート構造しかもっていないが、異常プリオン蛋白では40%以上の同シート構造をもつことが知られている。すなわち、伝達性海綿状脳症ないしはプリオン病の病因因子、すなわち異常プリオン蛋白の本体とはその蛋白の高次構造の変化、すなわち β シート構造を豊富にもつことによって感染性を獲得した蛋白であり、また、異常プリオン蛋白はそれ自身鑄型となり、正常プリオン蛋白を自己と同じものに変えることが知られている。

正常プリオン蛋白はプロテアーゼにより容易に分解され、界面活性剤で溶解されるが、これに対して異常プリオン蛋白はプロテアーゼ抵抗性で界面活性剤に不溶であり、通常の滅菌ではその感染性は失われない。

【0005】

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）はヒトにおける代表的なプリオン病である。これにはその原因が不明とされる弧発性、遺伝子の変異に基づく家族性、医療行為（硬膜移植、角膜移植、等）に基づく医原性が含まれる。

ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病（GSS）はプリオン遺伝子の変異に基づく遺伝性疾患である。

変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（v-CJD）はウシ海綿状脳症（BSE）に罹患したウシの神経組織を摂取したことが原因と推測されている。

クルーはパプアニューギニアのフォア（Fore）族の間で食人儀式により伝達していたことが知られている。

【0006】

プリオン病患者数は日本においては年間110から120例の新規患者が発生する。そのなかの約90%が弧発性クロイツフェルト・ヤコブ病、約5%が遺伝性、残りの5%が後天性でそのなかには 医原性および変異型クロイツフェルト・ヤコブ病が含まれる。

プリオン病のいくつかは、近年、重大な社会問題として浮かび上がっている。まず、日本におけるヒト乾燥硬膜移植歴のある患者の医原性クロイツフェルト・ヤコブ病の問題である。日本においては1973年から年間10000枚を超えるヒト乾燥硬膜が脳外科手術時の硬膜の補填に使用されたが、不幸にも異常プリオン蛋白に汚染された硬膜を使用したことによるとと思われる患者が多発しており、また潜在的に危険な硬膜を使用された疑いのある、およびそのことを完全に否定できない移植歴をもつ患者は20万人にも達すると考えられている。

【0007】

次に変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の問題である。変異型クロイツフェルト・ヤコブ病は前述したようにウシ海綿状脳症（BSE）に罹患したウシの神経組織を摂取したことが原因と推測されているが、欧州、特に英国では18万頭を超えるウシ海綿状脳症（BSE）が報告されており（Office International des Epizooties, 2002年11月21日付けデータ）、また確定あるいは疑似変異型クロイツフェルト・ヤコブ病患者の死者数は122例、生存中の患者を含めると130例に及ぶこと

から（英国Department of Health、2003年2月3日付けデータ）、今後の推測では数千から数万の患者が発生することが危惧されている。

【0 0 0 8】

プリオン病の診断には現時点では、1) 進行性痴呆を示すこと、2) 脳波検査で周期性同期性放電（PSD）を示すこと、3) CT、MRIで脳萎縮が進行していること、4) 脳脊髄液中14-3-3蛋白が増加すること、などを指標に評価する方法が一般的である。しかし、これらの診断法ではこの疾患を確定するには不十分であり、確定診断には、中枢神経系における異常プリオン蛋白の検出が最も確かな方法である。

多くの研究の結果、最初の臨床症状が現れるかなり前に、既にプリオン病特有の神経変性が始まっていることが判ってきた。また同病においては患者を取り巻く家族または臨床家が最初の臨床症状に気づいた時には、中枢神経系の病理像はすでに取り返しのつかない状態まで進行していることが知られている。

【0 0 0 9】

プリオン病の病理像は2つの主徴に代表される。すなわち中枢神経系におけるプリオン蛋白の蓄積と海綿状変性である。異常プリオン蛋白はプリオン病において特徴的であり、したがって特に脳内でこの蛋白をマーカーとして検出することが、同病の重要な診断法の1つとなりうる。

【0 0 1 0】

プリオン病の診断を目的として、脳内異常プリオン蛋白に特異的に結合する低分子有機化合物の探索が試みられている。しかしこれまでに異常プリオン蛋白に対して特異的に結合し、高い血液-脳関門透過性を有し、さらに毒性等に問題のない低分子有機化合物は未だ見いだされていない。

【0 0 1 1】

プリオン病の治療には現時点では特異的な治療法はなく、対症療法が主体である。近年、キナクリン、クロロキン、クロールプロジンなどがプリオン病の治療薬として注目されているが（非特許文献1および非特許文献2等参照）、その中で最も有望とされたキナクリンにおいても必ずしも期待通りの臨床効果は得られていない。

【0012】

【非特許文献1】

Doh-uraら、ジャーナル オブ ウイロロジイ、74巻、4894-4897、2000年

【非特許文献2】

Korthら、プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミイ オブ サイエ
ンセス USA、98巻、9836-9841、2001年

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記事情に鑑み、異常プリオン蛋白に対する結合特異性、ならびに血液-脳関門透過性が高く、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断プローブとして使用できる物質ならびにかかる物質を含む診断用組成物およびキットを提供することを課題とする。また本発明は、プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断プローブとして用いられる標識されたかかる物質、ならびにかかるプローブを含む画像診断用組成物およびキットも提供する。かかる物質、組成物およびキットはプリオン蛋白を鮮明に染色するものである。さらにプリオン蛋白が脳に蓄積する疾患、例えば、ヒトではクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病（GSS）、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（v-CJD）、致死性家族性不眠症（FFI）、クルー、ヒト以外の動物ではヒツジスクレイピー、ウシ海綿状脳症（BSE）、伝達性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症などの予防および／または治療用の、かかる物質を含む組成物を提供すること等も課題とする。

【0014】

【課題を解決するための手段および発明の実施の形態】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、式Iに示す化合物またはその塩もしくは溶媒和物が異常プリオン蛋白に対して非常に高い結合特異性を有し、さらに血液-脳関門透過性も高いことを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明化合物は、プリオン蛋白が蓄積する疾患の正確な早期診断・発見を可能にするものといえる。また、本発明化合物は血液-脳関門透過性も高いことから、生前における非侵襲性の診断が可能となる。さらに本発

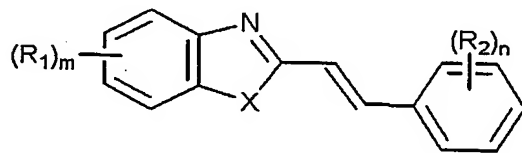
明化合物は、プリオン蛋白産生細胞による異常プリオン産生を抑制することが見
出され、プリオン蛋白が蓄積する疾患の予防および／または治療に有用であるこ
とが示された。したがって、本発明は、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断用プ
ローブ、ならびにそれを含む組成物およびキット、ならびにプリオン蛋白が蓄積
する疾患の予防および／または治療用組成物等を提供するものである。

【0015】

すなわち、本発明は、

(1) プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断プローブとして使用される、式 I :

【化2】



[式中、 R_1 および R_2 は独立して水素、ハロゲン、OH、COOH、SO₃H、NR₃R₄、NO₂、炭素数1～4個のアルキル、またはO-炭素数1～4個のアルキルであり、

R_2 がパラ位にある場合には当該パラ位の R_2 はNR₃R₄ でなく、

R_3 および R_4 は独立して水素、または炭素数1～4個のアルキルであり、

XはS、O、NHまたはCH₂であり、

mおよびnは独立して0～4の整数である]

で示される化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(2) N-407、N-408、N-438、N-440、N-441およびN-454からなる群より選択される上記(1)に記載の化合物、

(3) 標識されている上記(1)または(2)に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(4) 標識が放射性核種である上記(3)に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(5) 置換基 R_1 ないし R_4 のいずれかが放射線放出核種で標識されている上記(4)に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(6) 標識が γ 線放出核種である上記(4)または(5)に記載の化合物また

はその塩もしくは溶媒和物、

(7) γ 線放出核種が ^{99m}Tc 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{201}Tl 、 ^{123}I および ^{133}Xe からなる群より選択されるものである上記(6)記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(8) γ 線放出核種が ^{99m}Tc および ^{123}I からなる群より選択されるものである上記(7)記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(9) 標識が陽電子放出核種である上記(4)または(5)に記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(10) 陽電子放出核種が ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O および ^{18}F からなる群より選択される上記(9)記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(11) 陽電子放出核種が ^{18}F である上記(10)記載の化合物またはその塩もしくは溶媒和物、

(12) 上記(1)ないし(11)のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物および医薬上許容される担体を含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断用組成物、

(13) 上記(4)ないし(11)のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物および医薬上許容される担体を含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断用組成物、

(14) 上記(8)記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を含む上記(13)記載の組成物、

(15) 上記(11)記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を含む上記(13)記載の組成物、

(16) 上記(1)ないし(11)のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須の構成成分として含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断用キット、

(17) 上記(4)ないし(11)のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須の構成成分として含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断用キット、

(18) 上記(8)記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒

和物を必須の構成成分として含む上記(17)記載のキット、

(19) 上記(11)記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須の構成成分として含む上記(17)記載のキット、

(20) 被験動物から試料を得て、該試料に上記(1)ないし(11)のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を接触させることを特徴とする、生体内にプリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体の体外診断方法、

(21) 生体内にプリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体の体外診断のための、上記(1)ないし(11)のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を含む組成物、

(22) 生体内にプリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体の体外診断のための、上記(1)ないし(11)のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を必須構成成分として含むキット、

(23) 上記(1)または(2)記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物および医薬上許容される担体を含有する、生体内のプリオン蛋白の蓄積が病因または病因の一部となる疾患の予防および／または治療用医薬組成物、

(24) 疾患が伝達性海綿状脳症あるいはプリオン病からなる群より選択される請求項23記載の医薬組成物、ならびに

(25) 化合物がN-407、N-441、N-453およびN-457からなる群より選択されるものである上記(23)または(24)に記載の医薬組成物に関するものである。

【0016】

上記一般式(I)で示される本発明の化合物を、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断、予防および／または治療に使用することができる。また、式(I)の化合物は標識されていてもよく、特に、放射性標識された式(I)の化合物はプリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断に適している。

本発明の診断プローブとして使用される物質は上の一般式(I)で示される化

合物またはその塩もしくは溶媒和物である。特に断らない限り、本明細書において診断という場合には画像診断を含むものとする。

【0017】

以下、式 I の化合物の各置換基について説明する。

本明細書において、「炭素数 1～4 個のアルキル」という場合、メチル、エチル、プロピル、ブチル、およびそれらの構造異性体を包含するものとする。

R_1 および R_2 の例としては水素、フッ素、塩素、OH、COOH、SO₃H、NH₂、NO₂ またはメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、フェニル等が挙げられる。好ましい R_1 は水素または炭素数 1～4 個のアルキルであり、より好ましくは R_1 は水素またはメチルである。好ましい R_2 は水素、ハロゲン、炭素数 1～4 個のアルキル、または O-炭素数 1～4 個のアルキルであり、より好ましくは R_2 は水素、フッ素、塩素、メチルまたはメトキシである。さらに好ましくは R_2 はパラ位のフッ素または塩素である。

R_3 および R_4 の例としては水素、メチル等が挙げられる。

$R_1 \sim R_4$ のいずれかが標識されていてもよい。標識については後述する。

X は S、O、NH または CH₂ である。

m および n は独立して 0 ないし 4 の整数である。m または n が 0 以外の場合、 R_1 置換基または R_2 置換基はそれぞれが結合するベンゼン環のいずれの位置に存在していてもよい。複数の R_1 置換基が存在する場合、それぞれが同一であってもよく、また異なってもよい。このことは R_2 置換基についても同様である。

【0018】

式 I の化合物の塩も本発明に包含される。式 I の化合物中の窒素原子またはいずれかの官能基とともに塩が形成されてもよい。例えば、化合物中にカルボキシル基またはスルホン酸基が存在するような場合、これと金属との間に塩が形成されてもよい。かかる塩の例としては、リチウム、ナトリウム、カリウムのごときアルカリ金属との塩、マグネシウム、カルシウム、バリウムのごときアルカリ土類金属との塩等が挙げられる。式 I の化合物が水酸基を含む場合、その水素がナトリウム、カリウム等の金属となっている化合物も、本発明に包含される。さら

に、式 I の化合物と金属塩とで形成される錯体（例えば塩化マグネシウム、塩化鉄のごとき金属塩とで形成される錯体）も本明細書においては式 I の化合物の塩に含めることとする。本発明化合物を組成物またはキットに使用する場合、医薬上許容される塩であることが好ましい。また、本発明化合物は置換基 $R_1 \sim R_4$ の種類によっては陰イオンとともにオニウム塩を形成してもよく、かかる陰イオンとしてはハロゲン化物イオン、有機酸イオン、スルホン酸イオン、過塩素酸イオン等が挙げられる。かかるオニウム塩も医薬上許容されるものであることが好ましい。式 I の化合物の医薬上許容される塩としては、例えば、塩素、臭素、ヨウ素のごときハロゲン化物イオンとの塩、あるいはナトリウム、カリウム、カルシウムのごとき金属との塩がある。かかる塩は本発明に包含される。さらに本発明化合物は塩化鉄、塩化コバルトのごとき金属塩とで錯体を形成する場合もあり、かかる錯体も本発明に包含される。また、式 I の化合物の溶媒和物も本発明に包含される。溶媒和物としては、水和物、メタノール和物、エタノール和物、アンモニア和物等が挙げられる。本発明組成物またはキットに使用する場合、やはり医薬上許容されるものが好ましく、医薬上許容される溶媒和物としては、水和物、エタノール和物等が挙げられる。

【0019】

本明細書において、「本発明化合物」、「本発明の化合物」あるいは「式 (I) の化合物」という場合には、未標識または標識された式 I の化合物、ならびに、存在する場合にはその塩および溶媒和物を包含するものとする。特記しないかぎり、例えば、「N-407」という場合、未標識または標識された化合物 N-407 を包含するものとする。

本発明の化合物のなかでも好ましいものを表 1 に示した。

プリオン蛋白の染色の鮮明さの点からみると、特に好ましい本発明の化合物としては、N-407、N-408、N-438、N-440、N-441、N-454 が挙げられる（実施例 3、図 1 参照）

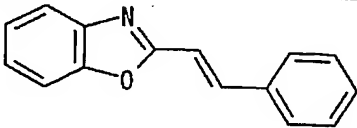
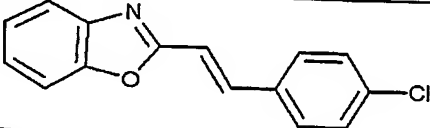
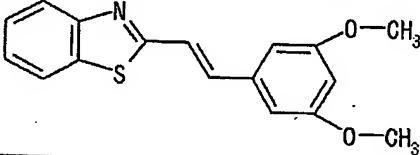
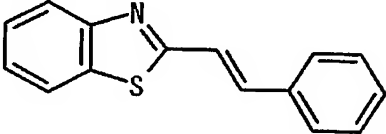
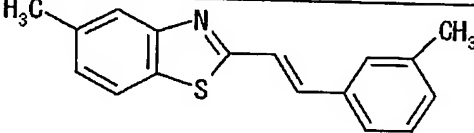
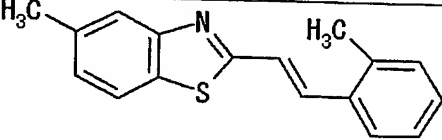
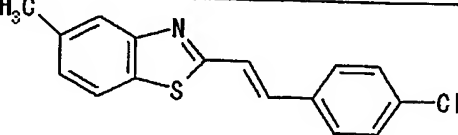
抗プリオン作用の点からみると、特に好ましい本発明の化合物としては、N-407、N-408、N-438、N-439、N-441、N-453、N-454、N-455、N-457 および N-491 が挙げられ、最も好ましい本

発明の化合物はN-407、N-441、N-453およびN-457である（表1、実施例4、表4、図2参照）。

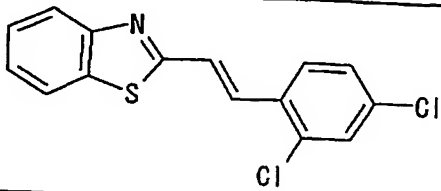
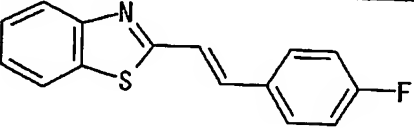
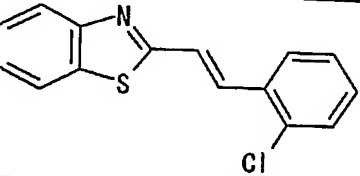
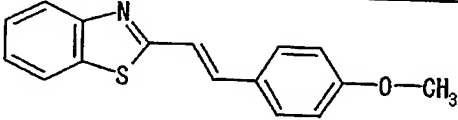
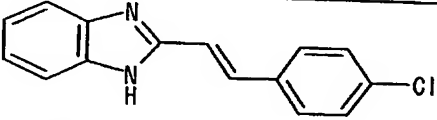
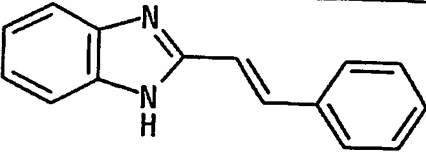
【0020】

【表1】

表1 本発明化合物の例

化合物	構造
N-407	
BF-191	
N-408	
N-438	
N-439	
N-440	
N-441	

【表 2】

N-452	
N-453	
N-454	
N-455	
N-457	
N-491	

【0021】

本発明においては、プリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体において、インビボで特異的に異常プリオン蛋白に結合する、標識された式 I の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を、プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断プローブとして使用する。あとで、実施例にて示すように、本発明化合物により生体内の異常プリオン蛋白が鮮明に染色される。本明細書における「プリオン蛋白が蓄積する疾患」とは、プリオン蛋白の脳内蓄積を主徴とする疾病をいい、プリオン蛋白をマーカーとして診断可能な疾病としては、例えば、ヒトではクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病 (GSS)、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (v-CJD)、致死性家族性不眠症

(FFI)、クルー、ヒト以外の動物ではヒツジスクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、伝達性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症などがあげられる。本明細書においてこれらの疾病をまとめて、プリオン病ということがある。

上述のごとく、最初の臨床症状が現れるかなり前に、既にプリオン病に特徴的な神経変性特有の神経変性が始まっていることが判ってきた。プリオン病が発症するかなり以前にプリオン蛋白の蓄積が始まると考えられる。したがって、プリオン蛋白を早期に検出することにより、プリオン病の早期発見・診断が可能になる。

よって、式(I)で示される化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を含む本発明のプリオン病診断用組成物は、その早期発見・診断に有用である。

【0022】

さらに本発明は、被験動物から試料を得て、該試料に上記(1)ないし(11)のいずれかに記載の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を接触させることを特徴とする、生体内にプリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体の検出方法にも関する。被験動物は哺乳動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、サル等が挙げられ、ヒトも被験動物に包含される。被験動物から得られる生体試料はいずれの種類のものであってもよいが、脳試料が一般的であるが、尿や血液等の体液であってよい。得られた生体試料を本発明の化合物(I)と接触させ、次いで、試料を顕微鏡観察により観察、同定するのが一般的である。あるいは化合物が標識されている場合には適当な手段、例えば、蛍光計、酵素反応の測定、シンチレーションカウンター等により同定を行なうこともできる。標識には、蛍光物質、アフィニティー物質、酵素基質、放射性核種等があり、これらの標識およびそれらの検出手段は当該分野においてよく知られている。

すなわち、本発明化合物はプリオン病の体外診断薬として使用することができる。本発明化合物は異常プリオン蛋白に結合することから、ヒトおよび動物のプリオン病の染色剤および体外診断薬としても応用できる。免疫染色およびウェスタン ブロットで異常プリオン蛋白を確認することによって確定診断してきたプリオン病を、本発明化合物を用いることにより、より容易に診断することができ

る。

例えば、これまでの技術ではウシ海綿状脳症の異常プリオン蛋白を確認するには同プリオン蛋白を1次検査および1次検査の再検査としてエライザ法、2次検査の確認検査の1としてウエスタン ブロット法、2次検査の確認検査の2として組織切片の免疫組織学的検査により確認しているが、脳切片または脳ホモジネートを、本発明化合物を用いて染色または定量することにより、より容易かつ短時間で異常プリオン蛋白を確認し、プリオン病を診断することができる。またリンパ組織、尿、血液中のプリオン蛋白を、本発明化合物を用いて確認することにより、プリオン病を診断することができる。さらにウシ由来食品、ウシ由来医療用製剤（例えばゼラチンカプセル）、ウシ由来化粧品（例えばコラーゲン）等中の異常プリオン蛋白を、本発明化合物を用いて確認することができる。

したがって、本発明は、被験動物から試料を得て、該試料に本発明の化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物を接触させることを特徴とする、生体内にプリオン蛋白が蓄積する疾患を有する個体の体外診断方法、ならびにかかる体外診断方法に使用される、本発明の化合物を含む体外診断用組成物および本発明の化合物を必須構成成分として含む体外診断用キットを提供する。

【0023】

特に、プリオン蛋白が蓄積する疾患のインビボでの診断においては本発明化合物を標識したものを診断プローブとして使用するのが一般的である。プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断には通常、放射性核種で標識したプローブを使用する。当該分野においてよく知られた方法により種々の放射性核種で本発明化合物を標識することができる。例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{131}I 等は以前から使用されている放射性核種であり、インビトロでの利用例が多い。画像診断プローブおよびその検出手段に求められる一般的要件としては、インビボで診断できること、患者へのダメージが少ないこと（特に非侵襲的であること）、検出感度が高いこと、半減期が適当な長さであること（標識プローブ調製時間、診断時間が適当であること）等が挙げられる。そこで、最近では、高い検出感度と物質透過性を示す γ 線を利用した陽電子断層撮影法（PET）または γ 線放出核種によるコンピューター断層撮影法（SPECT）が用いられるようになってきた。

このうち、PETは、陽電子放出核種から正反対の方向に放射される2本の γ 線を1対の検出器により同時計数法により検出するので、解像力や定量性に優れた情報が得られるので好ましい。SPECT用には ^{99m}Tc 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{201}Tl 、 ^{123}I 、 ^{133}Xe 等の γ 線放出核種で本発明化合物を標識することができる。 ^{99m}Tc および ^{123}I がSPECTによく用いられている。PET用には ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{62}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{76}Br 等の陽電子放出核種で本発明化合物を標識することができる。陽電子放出核種のなかでも、半減期が適当であること、標識しやすさ等の点から ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F が好ましく、 ^{18}F が特に好ましい。陽電子放出核種、 γ 線放出核種等の放射線放出核種での本発明化合物の標識位置は、式I中のいずれの位置であってもよい。あるいは環上の水素が陽電子放出核種、 γ 線放出核種等の放射線放出核種で置換されていてもよい。式Iの化合物の標識位置はいずれの位置であってもよいが、好ましい標識は置換基 R_1 または R_2 におけるものである。かかる標識された式Iの化合物も本発明に包含される。例えば、本発明化合物を ^{18}F で標識する場合、側鎖のいずれかが ^{18}F で標識されていてもよく、あるいは環上の水素が ^{18}F で置換されていてもよい。 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ のいずれかに含まれる水素を ^{18}F で置換してもよい。例えば、オキサゾリン環のベンゼン環部分の置換基(R_1)が ^{18}F であってもよい。

【0024】

一般的には、これらの核種はサイクロトロンまたはジェネレーターと呼ばれる装置により産生される。当業者は、産生核種に応じた産生方法および装置が選択可能である。そのようにして産生された核種を用いて本発明化合物を標識することができる。

これらの放射性核種で標識された標識化合物の製造方法は当該分野においてよく知られている。代表的な方法としては、化学合成法、同位体交換法および生合成法がある。化学合成法は従来から広く用いられており、放射性の出発物質を用いること以外は通常の化学合成法と本質的に変わらない。この方法により種々の核種が化合物に導入されている。同位体交換法は、簡単な構造の化合物中の ^3H 、 ^{35}S 、 ^{125}I 等を複雑な構造の化合物中に移して、これらの核種で標識さ

れた複雑な構造の化合物を得る方法である。生合成法は ^{14}C 、 ^{35}S 等で標識した化合物を微生物等の細胞に与えてこれらの核種が導入された代謝産物を得る方法である。

標識位置については、通常の合成と同様に合成スキームを目的に応じて設計することにより、所望位置に標識を導入することができる。かかる設計は当業者によく知られている。

また、例えば、比較的半減期の短い ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 等の陽電子放出核種を用いる場合、病院等の施設内の設置された（超）小型サイクロトロンから所望核種を得て、上記の方法により所望化合物を所望位置で標識して、即座に診断、検査、治療等に使用することも可能となっている。

これらの当業者に公知の方法により、本発明化合物の所望位置に所望核種を導入して標識することができる。

【0025】

画像診断の際の本発明標識化合物の対象への投与は局所的であってもよく、あるいは全身的であってもよい。投与経路としては、皮内、腹腔内、静脈、動脈、または脊髄液への注射または輸液等があるが、疾病の種類、使用核種、使用化合物、対象の状態、検査部位等の要因により選択できる。本発明プローブを投与して、プリオン蛋白への結合および崩壊のための十分な時間経過後、PET、SPECT等の手段で検査部位を調べることができる。これらの手段は、疾病の種類、使用核種、使用化合物、対象の状態、検査部位等の要因に応じて適宜選択できる。

放射性核種で標識された本発明化合物の用量は、疾病の種類、使用核種、使用化合物、対象の年齢、身体的状態、性別、疾病の程度、検査部位等により様々である。特に、対象の被曝量については十分に注意する必要がある。例えば、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F のごとき陽電子放出核種により標識された本発明化合物の放射エネルギーは、通常には、3.7メガベクレルないし3.7ギガベクレル、好ましくは、18メガベクレルないし740メガベクレルの範囲である。

【0026】

また本発明は、本発明化合物を含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断

用組成物を提供する。本発明組成物は、本発明化合物および医薬上許容される担体を含む。組成物中の本発明化合物は標識されていることが好ましい。上記のごとき標識法は様々であるが、インビボでの画像診断用途には放射性核種（特に ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F のごとき陽電子放出核種）で標識されていることが望ましい。本発明組成物の形態は、その目的からすれば注射あるいは輸液可能な形態であることが好ましい。したがって、医薬上許容される担体は液体であるものが好ましく、リン酸カリウム緩衝液、生理食塩水、リンゲル液、蒸留水等のごとき水性溶媒、あるいはポリエチレングリコール、植物性油脂、エタノール、グリセリン、ジメチルスルホキサイド、プロピレングリコール等のごとき非水性溶媒があるが、これらに限らない。担体と本発明化合物との配合比率は、適用部位、検出手段等に応じて適宜選択できるが、通常には 10 万対 1 ないし 2 対 1 の比率であり、好ましくは 1 万対 1 ないし 10 対 1 の比率である。また、本発明組成物はさらに公知の抗菌剤（例えば、抗生剤等）、局所麻酔剤（例えば、塩酸プロカイン、塩酸ジブカイン等）、バッファー（例えば、トリスー塩酸バッファー、ヘペスバッファー等）、浸透圧調節剤（例えば、グルコース、ソルビトール、塩化ナトリウム等）等を含含有していてもよい。

【0027】

さらに本発明は、本発明化合物を必須の構成成分として含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断用キットを提供する。通常には、キットは、本発明化合物、それを溶解する溶剤、バッファー、浸透圧調節剤、抗菌剤、局所麻酔剤等の各成分を別個に、あるいはいくつかを一緒にしてそれぞれの容器に入れたものをひとまとめにしたものである。本発明化合物は未標識であっても、標識されていてもよい。未標識の場合、上で説明したような通常の方法により、使用前に本発明化合物を標識することができる。また本発明化合物は凍結乾燥粉末等の固形として提供してもよく、あるいは適当な溶媒中に溶解して提供してもよい。溶剤としては上述の本発明組成物に用いる担体と同様のものであってよい。また、バッファー、浸透圧調節剤、抗菌剤、局所麻酔剤等の各成分も上述の本発明組成物に使用するものと同様のものであってよい。容器は種々のものを適宜選択できるが、本発明化合物への標識導入操作に適した形状とすることもでき、化合物の性質に応

じて遮光性の材質のものとしてもよく、あるいは患者への投与に便利のようにバイアル、または注射器等の形状とすることもできる。また、キットは診断に必要な器具類、例えば注射器、輸液セット、あるいは例えば陽電子放出核種にて標識された本発明化合物の場合にはPET装置に使用する器具類等を適宜含んでいてもよい。通常、キットには説明書を添付する。

【0028】

さらに上述のごとく、本発明化合物は異常プリオン蛋白に特異的であることから、異常プリオン蛋白の細胞毒性を抑制し、あるいは細胞による異常プリオン産生を抑制するものと考えられる。

したがって、本発明は、本発明化合物またはその医薬上許容される塩もしくは溶媒和物および医薬上許容される担体を含有する、プリオン蛋白の蓄積が病因または病因の一部となる疾患、例えば、ヒトではクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病（GSS）、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（ v -CJD）、致死性家族性不眠症（FFI）、クルー、ヒト以外の動物ではヒツジスクレイピー、ウシ海綿状脳症（BSE）、伝達性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症等のプリオン病の予防および／または治療用医薬組成物に関する。

かかる医薬組成物の処方形態は様々であるが、液体処方が好ましく、特に注射用処方が好ましい。かかる注射用処方を脳内に直接注入することもでき、あるいは、後で実施例にて示すように本発明化合物は血液／脳関門透過性が高いので、上記医薬組成物を静脈注射または静脈点滴用に処方して投与することもできる。かかる液体処方の調製は当該分野にて公知の方法で行うことができる。溶液の調製は、本発明化合物を適当な担体、注射用水、生理食塩水、リンゲル液等に溶解し、フィルター等で滅菌し、その後、適当な容器、例えば、バイアルまたはアンブルに充填する。また、溶液を凍結乾燥させ、使用時に適当な担体で再度溶液を調製することも可能である。本発明化合物を例えばエチレンオキシドにさらすことにより滅菌し、次いで、滅菌済み液体担体懸濁することにより懸濁液の調製を行うことができる。かかる処方の調製法および他の調製法は当該分野で公知である。

本発明化合物の投与量は、患者の病状、性別、年齢、体重等に左右されるが、一般的には、体重 70 kg の成人の場合、1 日あたり 0.1 mg ないし 1 g、好ましくは 1 mg ないし 100 mg、より好ましくは 5 mg ないし 50 mg である。一定期間かかる投与量で処置を行い、結果により投与量を増減することができる。

【0029】

【実施例】

実施例 1：本発明化合物の脳内移行性

マウスに本発明化合物を静脈内投与し、インビボにおける脳移行性を測定した。試験は下記手順によった。

- (1) マウスは 30-40g (7 週齢、n = 3) の Slc:ICR (日本 SLC) を用いた。
- (2) 被験化合物はポリエチレングリコール-400、エタノール、DMSO の混合溶液または単独溶液に溶解し、尾静脈から注入し、投与より 2 制御配列またはそれらの配列がそれらの目的のために協奏いて機能するように配置されコーディング配列の発現が達成されるように配置される。

分後にエーテル麻酔下で腹部大動脈からヘパリン処理注射筒を用いての採血、脳の採材をおこなった。

- (3) 血液は採血後 4℃、14,000rpm で 10 分間遠心し上清を血漿として -80℃ で保存した。脳 (小脳を含む) は採材後 -80℃ で保存した。

- (4) 使用時には血漿は溶解後、精製水で希釈した後、コンディショニングした C18 固相抽出カートリッジ (bond elute C18、200 mg、Lot. 070864、Varian) に添加しメチルアルコールにて溶出した。

- (5) 脳は使用時には凍結したまま湿重量を測定し生理食塩水を加え、ミキサーミル (MM300、Retsch) によりホモジェナイズを行った。ホモジェネートを 10 分間遠心し、上清をコンディショニングした C18 固相抽出カートリッジに添加し、メチルアルコールにて溶出を行った。

- (6) 被験化合物は高速液体クロマトグラフィーを用い、吸光および蛍光を検出した。

- (7) 血漿、脳それぞれについて、投与量に対する血漿もしくは脳内の被験化合

物含有量 (% ID / g 脳または % ID / ml 血漿) を求めた。

表 2 にマウスにおける被験化合物静脈内投与 2 分後の脳移行を示した。

N-407、N-438、N-441、N-453、N-457 および N-491 投与 2 分後の脳内含有量は 5.0 ~ 17 % ID / g 脳であった。

【0030】

【表 3】

表 2 本発明化合物の脳移行性

化合物	% ID / g または % ID / ml	
	脳	血漿
N-407	17	1.3
N-438	11	1.9
N-441	5.6	2.7
N-453	5.0	0.52
N-457	7.1	2.8
N-491	7.4	2.3

【0031】

中枢神経系を対象とした PET または SPECT 用化合物の脳移行性は 0.5 % ID / g 以上あれば十分と考えられている。その意味で N-407、N-438、N-441、N-453、N-457 および N-491 は極めて脳移行性の高い化合物である。

【0032】

実施例 2：本発明化合物の急性毒性

本発明化合物の急性毒性を、マウスを用いて静脈内投与で検討した。Crj:CD1 系雄性マウスを一群 4 匹として使用した (各群の平均体重は 31-32 g であった)。各化合物は 1 N HCl、エタノール、ポリエチレングリコール-400、DMSO 混合溶液または単独溶液に溶解し、尾静脈を介して投与し、以後 7 日まで観察した。

BF-125、BF-140 および BF-145 について上記方法により行った急性毒性試験の結果を表 3 に示す。

【0033】

【表 4】

表 3 本発明化合物の急性毒性試験結果

化合物	最大耐量 (mg/kg、静脈内投与)
N-407	≥ 10
N-438	≥ 10
N-441	≥ 10
N-458	≥ 10
N-457	≥ 10
N-491	≥ 10

【0034】

一般にヒトでのPET撮影にはポジトロン標識および未標識化合物の総投与量として、 1×10^{-12} から 1×10^{-5} mg/kg の静脈内投与が用いられ、多くはの場合、 1×10^{-10} から 1×10^{-7} mg/kg の静脈内投与が用いられる。これらの化合物の静脈内投与時の最大耐量とPET撮影時に必要な総化合物量をみてみると、両者の間には少なくとも10万倍以上の開きがあることから、これらの化合物はPET撮影用のプローブとしては極めて安全性の高い化合物と考えられる。

【0035】

実施例 3：剖検脳切片における異常プリオン蛋白の描出

病理学的に確定診断されたゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群 (GSS) および弧発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD) 患者の剖検脳ホルマリン固定切片 ($7 \mu\text{m}$ 厚) を脱パラフィン・脱脂処理し、50%エタノールに溶解した被験化合物溶液 ($10\text{--}200 \mu\text{M}$) で30分間染色した。50%エタノールにて分別を行った後に水洗し、コンフォーカル・レーザー顕微鏡 (ライカ社、DMRXA) にてFITCフィルターあるいはUVフィルターを用いて切片上の蛍光シグナルを観察した。組織切片中の異常プリオン蛋白の検出は、Doh-uraらの方法 (ジャーナル オブ

ニューロパソロジー アンド エクスペリメンタル ニューロロジイ、59巻、774-785ページ、2000年) に従い、脱パラフィン・脱脂処理した組織切片を希塩酸 (1-2 mM) 中でオートクレーブ10分間処理を行い、抗ヒトプリオン蛋白抗体 3F4 (Senetec社、500倍希釈) を一次抗体、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を2次抗体として免疫反応を行い、呈色反応はディアマノベンチジンをを用いた。

【0036】

N-407、N-408、N-438、N-440、N-441およびN-454のいずれを用いてもGSS患者脳において、小脳皮質を中心に斑状の蛍光シグナルが見られた(図1)。これらの斑状構造物は、連続する切片におけるプリオン蛋白の免疫染色で確認された異常プリオン蛋白の斑状沈着物(クルー斑、矢印)に一致していた。いずれの化合物も特異的にプリオン蛋白アミロイド斑が描出され、非特異的な染色像(例えば血管や結合織)は認められなかった。

【0037】

実施例4：異常プリオン持続培養細胞モデルにおける抗プリオン作用の検討

ヒツジプリオン病であるスクレイピーの感染因子が持続感染したマウス神経芽細胞腫細胞(ScN2a) (Raceら、ジャーナル オブ ウイロロジイ、62巻、2845-2849、1998年) を使用して、被験化合物の異常(蛋白分解酵素抵抗性)プリオン蛋白の産生阻害効果をDoh-uraらの方法(ジャーナル オブ ウイロロジイ、74巻、4894-4897、2000年) に従い検討した。細胞(培養フラスコにコンフルエント状態の細胞数の十分の一の細胞数)を継代する際に培養液(10%牛胎児血清加OPTI-MEM培地(GIBCO BRL社))中に100% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した被験化合物溶液を種々の濃度(1 nM-1 μ M) で加えた。DMSO単独を培地中に加えたものをコントロールとした。4日後にコントロールの細胞がコンフルエントとなった状態で、化合物投与群の細胞増殖障害の有無を細胞数計測により評価した後細胞をリン酸バッファーで洗い、溶解液(0.5% デオキシコール酸、0.5% Nonidet P40、リン酸バッファー) で細胞を溶解した。細胞溶解液を軽遠心して核酸成分を除き、上清にプロテイナーゼK(最終濃度10 μ g/ml)を加え、37°C 30分間反応させた。次にセリンプロテアーゼ阻害剤PMSF(最終濃度10 μ g/ml、4°C)を

加えて反応を止め、反応液を超遠心 (371,000g、30分、室温) した。その沈渣を1×SDSサンプルバッファーに懸濁し熱変性後に15% Tris-glycin-SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動蛋白はPVDFメンブレンに転写し、抗プリオン蛋白抗体 (PrP2B (プリオン蛋白アミノ酸残基89-103のペプチドに対するウサギ・ポリクローナル抗体)、5000倍希釈) を一次抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体を二次抗体としたウェスタンブロット法を行い、CDP-Star反応液 (アマーシャム社) にてシグナルを可視化した。

【0038】

N-407、N-408、N-438、N-439、N-440、N-441、N-452、N-453、N-454、N-455、N-457およびN-491のいずれにおいてもScN2aにおける異常プリオン蛋白の産生阻害効果を認めた (図2、3つの矢印はすべて異常プリオン蛋白)。異常プリオン蛋白産生を50%に抑える化合物濃度 (IC₅₀ (50% inhibition concentration)) は1-100 nMであり、また細胞増殖を障害する濃度 (TC; toxic concentration) は100 μMであったことより、これらの化合物の安全濃度域 (TC/IC₅₀) は1000から100000の間と考えられた (表4)。

一方、キナクリン (quinacrine) の安全濃度域は5であった (Doh-uraら、ジャーナル オブ ウイロロジイ、74巻、4894-4897、2000年より引用)。

【0039】

【表 5】

表 4 本発明化合物の異常プリオン蛋白産生阻害効果、細胞増殖を阻害する濃度および安全濃度域

化合物 No.	異常プリオン蛋白産生阻害効果 IC ₅₀ (nM)	細胞増殖を障害する濃度 TC (μM)	安全濃度域 (TC/IC ₅₀)
N-407	1	100	100,000
N-408	10	100	10,000
N-438	10	100	10,000
N-439	10	100	10,000
N-440	100	100	1,000
N-441	1	100	100,000
N-452	100	100	1,000
N-453	1	100	100,000
N-454	10	100	10,000
N-455	10	100	10,000
N-457	1	100	100,000
N-491	10	100	10,000
キナクリン	400	2	5

【0040】

N-407、N-408、N-438、N-440、N-441およびN-454のいずれもが、斑状の異常プリオン蛋白沈着を容易に描出し、感染細胞で病原因子である異常プリオン蛋白の産生を阻害することが明かとなった。この結果は、これらの化合物がプリオン病患者において異常プリオン蛋白を描出するためのプリオン・バイオイメーシング・プローブに応用できるだけでなく、プリオン病の治療薬や予防薬として応用できる可能性があることを示している。

【0041】

プリオン病の標的臓器は中枢神経系であり、感染因子プリオンすなわち異常プリオン蛋白は中枢神経系内に蓄積して神経変性をきたす。プリオン病の確定診断

には脳内に沈着した異常プリオン蛋白を証明することであるが、生存中は脳外科手術による脳組織の生検を行わない限り診断を確定することは出来ない。また、動物実験では発症以前の段階から既に異常プリオン蛋白の脳内蓄積が始まっており、病気が進行するに従ってその沈着量が増加することが判明している (Doh-uraら、ジャーナル オブ ジェネティック ウイロロジイ、80巻、1551-1556、1999年)。組織切片上でアミロイドである異常プリオン蛋白を描出する試薬としてはコンゴレッドやチオフラビンなどが知られているが、今回検討した化合物はいずれもこれらの試薬よりも、より高感度かつ特異的に異常プリオン蛋白の斑状沈着物を描出した。したがって、脳移行性が高いこれらの化合物を放射性同位元素で標識し、プリオン病が疑われる患者の末梢より投与することにより、PETやSPECTといった核医学的方法にて脳内に沈着した異常プリオン蛋白を描出し、プリオン病の早期診断や病気の進行状況把握に利用できる。

【0042】

一方、プリオン病の感染因子プリオンの増殖を阻害する化合物は予防薬・治療薬として期待される。プリオンの増殖とは、異常プリオン蛋白の産生であることから、この産生を阻害・抑制する化合物がプリオン病治療薬である。N-407、N-408、N-438、N-439、N-440、N-441、N-452、N-453、N-454、N-455、N-457およびN-491 はいずれも異常プリオン蛋白の産生を阻害しており、それらの安全濃度域も1,000から100,000の間と推測された。

【0043】

これまで、異常プリオン蛋白産生阻害剤として有効であることが報告されている化合物にはCongo redや硫酸多糖体 (Caughey and Roymond、ジャーナル オブ ニューロケミストリイ、59巻、768-771、1992年、Caughey and Roymond、ジャーナル オブ ウイロロジイ、67巻、643-650、1993年)、cyclic tetrapyrrole (porphyrin化合物やphthalocyanine化合物) (Caughey ら、プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA、95巻、12117-12122、1998年)、branched polyamine (polyamidoamineや polypropyleneimine dendrimer) (Supattaponeら、ジャーナル オブ ウイロロジイ、75巻、3453-3461、2001年)、キナクリンやクロロキンなどのリソゾーム蓄積性薬剤やE-64dシス

テインプロテアーゼ阻害剤 (Doh-uraら、ジャーナル オブ ウイロロジイ、74巻、4894-4897、2000年) などがあげられる。これらの化合物は脳移行性に問題があり、また脳移行性に優れていてもその安全濃度域が極めて狭く実用化には向かないものが大半である。例えば、上述の化合物はキナクリンを除いて脳移行性は極めて低い。また最近、話題を集めているキナクリンは安全濃度域が極めて狭い (10以下) ことが報告されている (Doh-uraら、ジャーナル オブ ウイロロジイ、74巻、4894-4897、2000年)。

【0044】

次に本発明化合物の体外診断薬としての利用可能性について述べる。本発明化合物は異常プリオン蛋白に結合することから、ヒトおよび動物のプリオン病の染色剤および体外診断薬としても応用できる。エライザ法、ウエスタン プロット、免疫染色で異常プリオン蛋白を確認することによって確定診断してきたプリオン病を、本発明化合物を用いることにより、より容易に診断することができる。

例えば、これまでの技術ではウシ海綿状脳症の異常プリオン蛋白を確認するには同プリオン蛋白をエライザ法、ウエスタン プロット法、または免疫染色により確認しているが、脳切片または脳ホモジネートを本発明化合物を用いて染色または定量することにより、より容易かつ短時間で異常プリオン蛋白を確認し、プリオン病を診断することができる。またリンパ組織、尿、血液中の異常プリオン蛋白を本発明化合物を用いて確認することにより、プリオン病を診断することができる。さらにウシ由来食品、ウシ由来医療用製剤 (例えばゼラチンカプセル)、ウシ由来化粧品 (例えばコラーゲン) 等中の異常プリオン蛋白を本発明化合物を用いて確認することができる。

【0045】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明化合物は、異常プリオン蛋白に対する特異性が高く、血液-脳関門透過性が高く、しかも極めて安全性の高いものである。したがって、本発明化合物はプリオン病の早期診断・発見に極めて有用である。本発明によれば、本発明化合物を含む、プリオン蛋白が蓄積する疾患の診断用組成物およびキットが提供される。さらに本発明によれば、本発明化合物を含有する、プ

リオン蛋白の蓄積が病因または病因の一部となる疾患の予防および／または治療用の組成物も提供され、上述の早期診断・発見と組み合わせて、プリオン病の早期有効治療が可能となる。

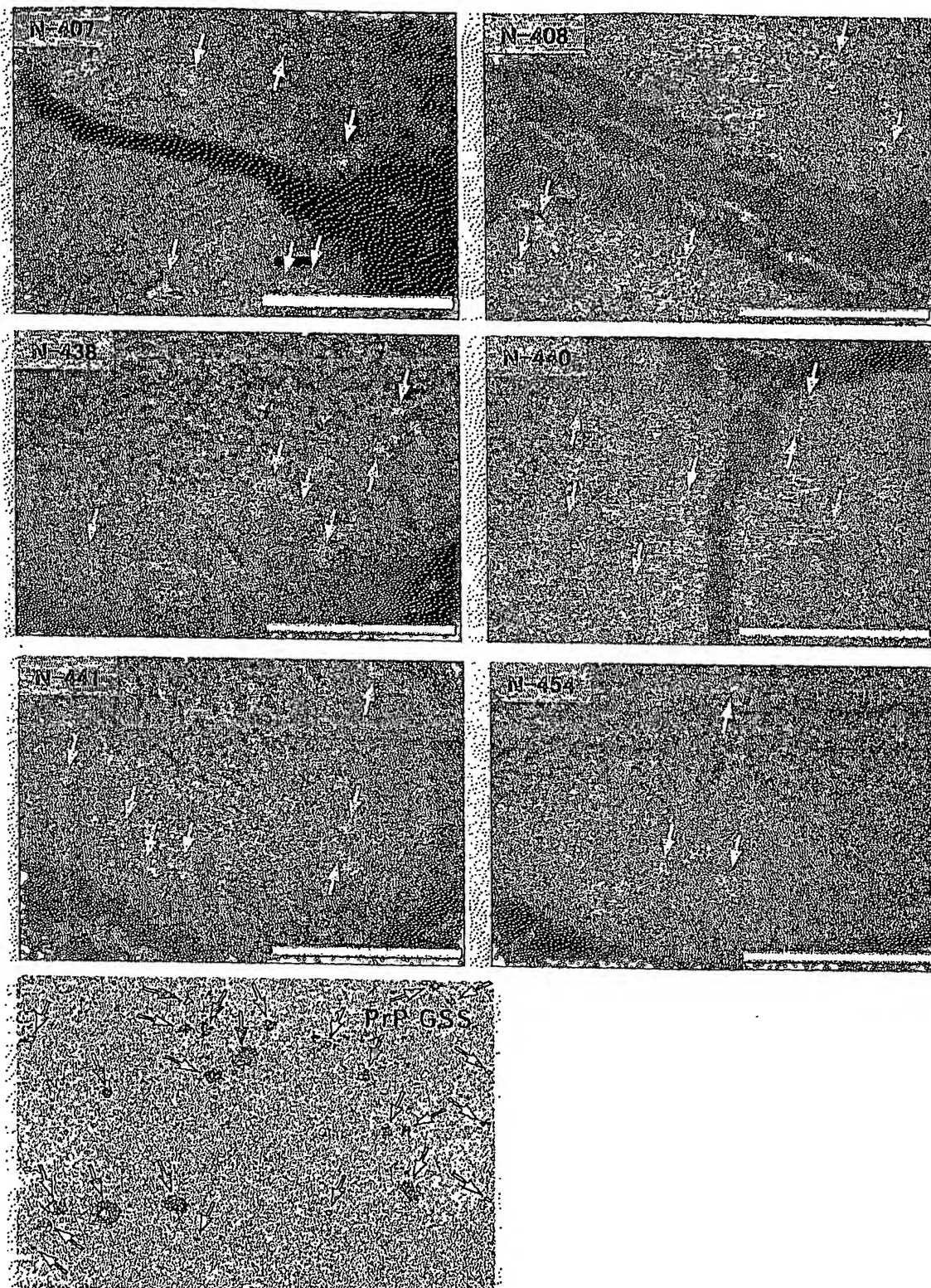
【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明化合物（N-407、N-408、N-438、N-440、N-441、N-454）による、GSS患者脳の連続した切片における異常プリオン蛋白の斑状沈着物（クルー斑：図中の矢印）の検出を示す。いちばん下のPrP GSSのパネルは連続した切片における異常プリオン蛋白の免疫染色を示す（スケールバーは100 μ m）。

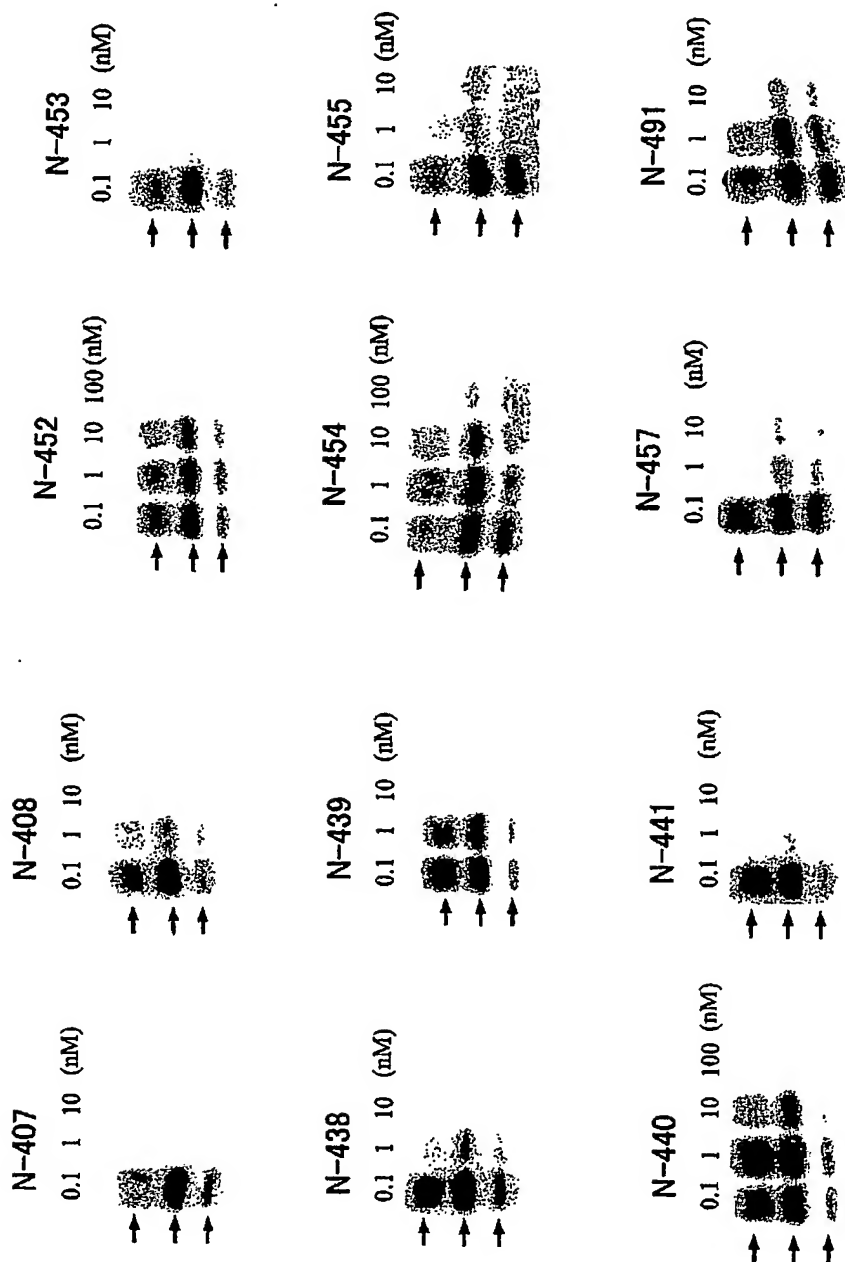
【図2】 本発明化合物（N-407、N-408、N-438、N-439、N-440、N-441、N-452、N-453、N-454、N-455、N-457、N-491）による、異常プリオン持続培養細胞ScN2aにおける異常プリオン蛋白（図中の3つの矢印）の産生阻害効果を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



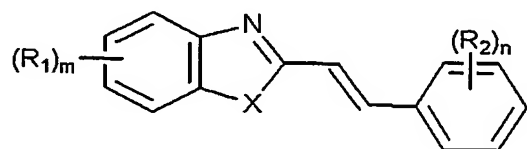
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プリオン蛋白蓄積性疾患の診断、予防および／または治療に有用な化合物を見出す。

【解決手段】 プリオン蛋白が蓄積する疾患の画像診断プローブ、予防および／または治療薬として使用される、式 I :

【化 1】



[式中、 R_1 および R_2 は独立して水素、ハロゲン、 OH 、 $COOH$ 、 SO_3H 、 NR_3R_4 、 NO_2 、炭素数 1～4 個のアルキル、または O-炭素数 1～4 個のアルキルであり、

R_2 がパラ位にある場合には当該パラ位の R_2 は NR_3R_4 でなく、

R_3 および R_4 は独立して水素、または炭素数 1～4 個のアルキルであり、

X は S 、 O 、 NH または CH_2 であり、

m および n は独立して 0～4 の整数である]

で示される化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 7 3 3 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 9 0 0 9 4 3 5]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 2 月 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目 1 7 番 8 5 号

氏 名

株式会社 ビーエフ研究所

特願2003-073344

出願人履歴情報

識別番号

[502317286]

1. 変更年月日
[変更理由]
住所
氏名

2002年 8月30日
新規登録
福岡県福岡市城南区茶山6-16-76-701
堂浦 克美

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.